

Detection of a substance in a fluid, for use in microbiological applications, comprises using a cell with receptors and electrodes, where the substance binds to microparticles during the measurement stage

Publication number: DE10138497
Publication date: 2002-10-31
Inventor: BINDER JOSEF (DE); BENECKE WOLFGANG (DE); DOBRINSKI HEIKO (DE); BLOHM DIETMAR (DE)
Applicant: CAMPUS MICRO TECHNOLOGIES GMBH (DE)
Classification:
- **International:** C12Q1/68; G01N27/02; G01N33/543; C12Q1/68; G01N27/02; G01N33/543; (IPC1-7) G01N33/50; C12Q1/68; G01N27/416
- **European:** C12Q1/68B2H; G01N27/02; G01N33/543K2
Application number: DE20011038497 20010804
Priority number(s): DE20011038497 20010804; DE20011019722 20010421

[Report a data error here](#)

Abstract of DE10138497

Detection of a substance in a fluid comprises that the substance is bonded with microparticles (30), during a stage in which electrical variations caused by binding to receptors in the cell are measured.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 38 497 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
G 01 N 33/50
C 12 Q 1/68
G 01 N 27/416

②① Aktenzeichen: 101 38 497.1
②② Anmeldetag: 4. 8. 2001
④③ Offenlegungstag: 31. 10. 2002

DE 101 38 497 A 1

⑥⑥ Innere Priorität:
101 19 722. 5 21. 04. 2001

⑦① Anmelder:
Campus Micro Technologies GmbH, 28359 Bremen,
DE

⑦④ Vertreter:
Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

⑦② Erfinder:
Binder, Josef, 27726 Worpswede, DE; Benecke,
Wolfgang, 27412 Vorwerk, DE; Dobrinski, Heiko,
28359 Bremen, DE; Blohm, Dietmar, 27711
Osterholz-Scharmbeck, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ IDS/MP zur Erfassung von biochemischen Rezeptor-Ligand-Systemen

⑤⑦ Es wird ein Verfahren zum Nachweisen einer Substanz in einer Flüssigkeit angegeben, bei dem eine die Substanz enthaltende Flüssigkeit in eine Messzelle eingegeben wird, die zumindest zwei Messelektroden und eine Oberfläche mit ersten Rezeptoren zum Binden der Substanz umfasst, und bei dem Änderungen elektrischer Größen mittels der Messelektroden gemessen werden, wobei die Änderungen durch das Binden der Substanz an die ersten Rezeptoren hervorgerufen werden. Die nachzuweisende Substanz kann insbesondere eine Nucleinsäure sein. Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz während des Messens der Änderungen elektrischer Größen mit Mikropartikeln verbunden ist.

DE 101 38 497 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen einer Substanz in einer Flüssigkeit, bei dem eine die Substanz enthaltenden Flüssigkeit in eine Messzelle eingegeben wird, die zumindest zwei Messelektroden und eine Oberfläche mit ersten Rezeptoren zum Binden der Substanz umfasst, und bei dem Änderungen elektrischer Größen mittels der Messelektroden gemessen werden, wobei die Änderungen durch das Binden der Substanz an die ersten Rezeptoren hervorgerufen werden. Ein Rezeptor ist dabei eine Substanz, die eine nachzuweisende Substanz binden (anlagern) kann.

[0002] Messzellen und Nachweisverfahren nach dem EIS-Prinzip (Elektrolyte-Insulator-Semiconductor-Prinzip) wurden bereits in der Vergangenheit verwendet (vgl. Schyberg et al., Sens. & Act. B26-27, 1995, 457 oder auch Souteyrand et al., Sens. & Act. B20, 1994, 63). Dabei werden elektrochemische Messanordnungen verwendet, die räumlich weit voneinander entfernt Messelektroden zum Erfassen von Molekülen in elektrodennahen, dünnen Grenzschichten besitzen, wobei ein Isolator als Kopplungs- und Übertragungselement wirkt. Nachteilig ist jedoch, dass bei diesen Verfahren und Messanordnungen bereits die Anwesenheit geringer Mengen von Fremdstoffen die Messgenauigkeit erheblich verringern können. Dieser Effekt ist insbesondere schon bei geringen Mengen an Elektrolyten zu beobachten.

[0003] Gegenwärtig wird versucht, Messzellen mit Elektrodenabständen im Submikrometerbereich herzustellen, um eine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit zu erreichen (siehe dazu beispielsweise Hoffmann et al., Transducer '95-Eurosensors IX, 1995, 837, oder Van Gerwen et al., Sens. & Act. B49, 1998, 73). Solche Messzellen sind jedoch nur aufwendig herstellbar. Ferner beseitigen sie nicht das grundlegende Problem, dass der Einfluss von Elektrolyten auf die mittels der Messelektroden gemessenen elektrischen Größen zum Teil in gleicher Größenordnung wie jene Änderungen liegt, die durch die nachzuweisenden Moleküle (Substanzen) verursacht werden. Dementsprechend erfordern derartige Nachweisverfahren einen besonders hohen Aufwand und können eine hohe Fehlerrate aufweisen.

[0004] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren anzugeben, um eine Substanz in einer Flüssigkeit nachzuweisen, wobei die zuvor beschriebenen Nachteile verringert oder gänzlich ausgeschaltet werden sollten. Bevorzugt ist es dabei, wenn der Nachweis auch die Bestimmung der Konzentration oder Menge der Substanz in der Flüssigkeit umfasst.

[0005] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art, bei dem die Substanz in Schritt b) mit Mikropartikeln verbunden ist.

[0006] Die Verwendung von Mikropartikeln zur Präparation und Separation von Biomolekülen wie z. B. DNA ist in die Laborroutine eingegangen (siehe beispielsweise Dynal A. S. 3rd ed.: Dynal Corp.: Oslo, Norwegen, 1998). Insbesondere ist die Anbindungskinetik von Nucleinsäuren an Mikropartikel intensiv untersucht worden (siehe beispielsweise Stevens et al., Nucleic Acids Res., 1999, 7, oder Day et al., Biochem J. 278, 1991, 735).

[0007] Überraschend wurde nun gefunden, dass es möglich ist, Mikropartikel zusammen mit bekannten Messzellen zu verwenden, ohne dass die Mikropartikel die Messelektroden oder die Beschichtung mit dem ersten Rezeptor beschädigen. Der Begriff "Mikropartikel" umfasst auch Nanopartikel.

[0008] Da die Änderung der elektrischen Größen, insbesondere des elektrischen Feldes, hauptsächlich von der An-

wesenheit der Mikropartikel verursacht wird, ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auf vorteilhaft einfache Weise möglich, den durch Elektrolyten und andere Fremdstoffen hervorgerufenen Messfehler erheblich zu verringern, so dass dieser in manchen Fällen völlig vernachlässigt werden kann.

[0009] Mit dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren können nachzuweisende Substanzen in niedrigeren Konzentrationen als mit den eingangs beschriebenen Verfahren sicher nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere beim Nachweis von Nucleinsäuren vorteilhaft, da diese bisher in einem Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren (PCR) oder einem vergleichbaren Verfahren zunächst vervielfältigt werden mussten, um die Nachweisgrenze zu erreichen. Bei solchen Vervielfältigungen können jedoch Fehler auftreten. Insbesondere kann nicht oder nur unter hohem Aufwand sichergestellt werden, dass die vervielfältigte Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure proportional ist zur ursprünglich vorliegenden Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure. Dadurch wird die Quantifizierung der nachzuweisenden Nucleinsäure erheblich erschwert oder unmöglich gemacht. Ferner kommt hinzu, dass unterschiedliche Nucleinsäuren unterschiedliche Vervielfältigungs-Effizienzen in PCR-Verfahren besitzen können, so dass in herkömmlichen Verfahren die Vergleichbarkeit der Messergebnisse unterschiedlicher Nucleinsäuren nicht mehr gesichert ist. Diese Nachteile werden durch das erfindungsgemäße Verfahren auf vorteilhaft einfache Weise ausgeräumt oder gemildert.

[0010] Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren erlaubt zudem, die nachzuweisende Substanz anhand der Mikropartikel aus einer Lösung auf vorteilhaft einfache Weise zu extrahieren und in unmittelbarem Anschluss hieran mit der Elektrodenanordnung nachzuweisen.

[0011] Schließlich erlaubt es das erfindungsgemäße Verfahren auch, biochemische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen wie beispielsweise Affinitäten, wie sie bei Nucleinsäurehybridisierungen eine Rolle spielen, zu bestimmen.

[0012] Bevorzugt umfassen die Messelektroden, wie sie im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, dünne Schichten aus Metallen, insbesondere aus Gold oder aus Platin, oder anderen elektrisch leitfähigen Materialien. Die Messelektroden sind vorzugsweise zu einer Interdigitalstruktur verzahnt. Der Elektrodenabstand liegt bevorzugt im Submikrometerbereich. Die Elektroden sind auf einem Trägermaterial angeordnet, das vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt ist, die Glas, Silizium und Kunststoffe umfasst.

[0013] Der erste Rezeptor ist vorzugsweise über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an die Oberfläche in der Messzelle gebunden. Dabei kann die Oberfläche auch Oberflächenabschnitte der Messelektroden umfassen.

[0014] Der erste Rezeptor bindet im wesentlichen nur an die nachzuweisende Substanz und nicht an weitere in der Flüssigkeit vorliegende Substanzen. Der Ausdruck "im wesentlichen" bedeutet dabei, dass die Bindung des ersten Rezeptors an die nicht nachzuweisenden Substanzen nur in so geringem Ausmaß erfolgt, dass der Nachweis der nachzuweisenden Substanz nicht verhindert oder wesentlich erschwert wird. Die Stringenz der Bindung des ersten Rezeptors an die nachzuweisende Substanz wird vorzugsweise durch das Einstellen der Temperatur und/oder des pH-Wertes der Flüssigkeit eingestellt.

[0015] Die Mikropartikel können vorzugsweise in direkter Nähe der Messelektroden binden. Sobald die Mikropartikel in die Nähe der Messelektroden geraten, können sie ein zwischen den Messelektroden bestehendes elektrisches Feld stören und eine Änderung beispielsweise der Leitfähigkeit und/oder Kapazität der Messzelle herbeiführen. Diese An-

derung ist messbar und kann als indirekter Nachweis eines Bindungsereignisses eines Mikropartikels an die Oberfläche der Messzelle verwendet werden.

[0016] Die Messzelle ist vorzugsweise in einer Durchflusszelle, insbesondere in einem mikrofluidischen System, angeordnet, so dass die Flüssigkeit, die die Mikropartikel und die nachzuweisende Substanz umfasst, vorteilhaft einfach mit den Messelektroden und der Oberfläche in Kontakt gebracht und gegebenenfalls auch wieder abgewaschen werden kann.

[0017] Besonders bevorzugt ist ein Verfahren der beschriebenen Art, bei dem die Substanz vor oder während Schritt b) über zweite Rezeptoren mit den Mikropartikeln verbunden wird. Dadurch ist auf vorteilhaft einfache Weise möglich, auch solche Substanzen nachzuweisen, die nicht von vornherein mit Mikropartikeln verbunden sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass Mikropartikel jeweils zum Nachweisen verschiedener Substanzen durch Ankoppeln unterschiedlicher zweiter Rezeptoren vorgefertigt werden können. Dadurch wird die Automatisierung eines erfindungsgemäßen Verfahrens und ein hoher Probendurchsatz auf vorteilhafte Weise gefördert. Zweckmäßigerweise sind die zweiten Rezeptoren auf der Oberfläche der Mikropartikel immobilisiert.

[0018] Die Mikropartikel sind vorzugsweise über eine Streptavidin-Biotin-Bindung mit den zweiten Rezeptoren verbunden. Die zweiten Rezeptoren können entweder geeignet sein, spezifisch an die nachzuweisende Substanz zu binden; sie können jedoch auch unspezifischer sein und an eine Vielzahl von Substanzen binden.

[0019] Ferner ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem die Mikropartikel magnetisch, vorzugsweise ferromagnetisch sind. Solche Mikropartikel sind sehr preiswert. Verfahren zur Anbindung unterschiedlichster Rezeptoren an solche Mikropartikel sind seit langem bekannt und optimiert.

[0020] Magnetische Mikropartikel erlauben es außerdem auf vorteilhaft einfache Weise, die mit Mikropartikeln verbundene Substanz aus einer flüssigen Phase zu extrahieren und zu waschen. Wird eine solche Extraktion vor Durchführen eines erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens durchgeführt, so können auf vorteilhaft einfache Weise eventuelle störende Begleitstoffe entfernt werden. Im Anschluss an ein erfindungsgemäßes Nachweisverfahren erlauben es magnetische Mikropartikel zudem, aus der Messzelle abgewaschene Substanz auf vorteilhaft einfache Weise wiederzugewinnen.

[0021] Ferner ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem die nachzuweisende Substanz während Schritt b) im wesentlichen vollständig an Mikropartikel gebunden vorliegt. In diesem Fall enthält die Flüssigkeit in Schritt b) keine freie nachzuweisende Substanz. Zweckmäßigerweise wird die an Mikropartikel gebundene von der nicht gebundenen Substanz abgetrennt. Dies kann beispielsweise anhand der vorzugsweise magnetischen oder ferromagnetischen Mikropartikel geschehen. Durch die Abtrennung wird auf vorteilhaft einfache Weise die Konkurrenz zwischen nachweisbarer, mikropartikelgebundener Substanz und der schwerer nachweisbaren, nicht mikropartikelgebundenen Substanz um den ersten Rezeptor verringert, so dass die Messqualität und Nachweisempfindlichkeit verbessert wird.

[0022] Ferner ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem die Substanz eine Nucleinsäure umfasst und die ersten und/oder die zweiten Rezeptoren jeweils eine erste bzw. zweite Nachweis-Nucleinsäure umfassen, die jeweils mit einem Abschnitt der Nucleinsäure der Substanz hybridisieren kann. Nucleinsäuren im Sinne des Nachweisverfahrens sind Substanzen, die eine oder mehrere Nucleobasen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil) oder deren funktionale Ana-

loga, wie zum Beispiel Hypoxanthin, umfassen, wobei die Nucleobasen durch ein Pentosephosphat-Rückgrat oder eines seiner funktionellen Äquivalente verbunden sind. Wesentliches Merkmal von Nucleinsäuren ist, dass zwei Nucleinsäuren anhand ihrer Nucleobasen miteinander hybridisieren können. Die Verbindung von Nucleinsäuren durch Hybridisieren, also durch Anlagerung zweier Nucleinsäuren unter Bildung einer möglichst hohen Zahl komplementärer Basenpaarungen, gehört zur Laborroutine, so dass der Fachmann eine entsprechende Anpassung und Optimierung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens leicht selbst vornehmen kann. Insbesondere ist der Fachmann in der Lage, bei bekannter Sequenz der von der nachzuweisenden Substanz umfassten Nucleinsäure Nachweis-Nucleinsäuren für die ersten und/oder zweiten Rezeptoren zum Binden jeweils eines Abschnitts der von der Substanz umfassten Nucleinsäure herzustellen. Werden Nucleinsäuren sowohl für die ersten als auch für die zweiten Rezeptoren verwendet, so werden die Nucleinsäuren vorzugsweise so gewählt, dass sie unter den gewählten Verfahrensbedingungen möglichst wenig oder gar nicht miteinander hybridisieren.

[0023] Ferner ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem der Abstand zwischen jeweils zwei benachbarten Messelektroden der Messzelle weniger als 5 Mikrometer, vorzugsweise 2 oder weniger Mikrometer, besonders bevorzugt 500 Nanometer oder weniger beträgt. Durch Verringerung des Elektrodenabstandes in dem Submikrometerbereich lassen sich auf vorteilhafte Weise die Einflüsse störender Substanzen verringern. Im Bereich zwischen 5 Mikrometern und 500 Nanometern ist zudem der Aufwand für das Herstellen der Messelektroden bei ausreichend niedriger Nachweisgrenze, also bei ausreichend hoher Empfindlichkeit der Messelektrode im erfindungsgemäßen Verfahren, noch vertretbar gering.

[0024] Ferner ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem die Messelektroden mit einer Oberflächenpassivierungsschicht versehen sind. Durch eine solche Oberflächenpassivierungsschicht werden die Messelektroden vor Beschädigungen geschützt, so dass sie auf vorteilhafte Weise in hoher Qualität wiederverwendet werden können.

[0025] Dabei ist es bevorzugt, wenn die Oberflächenpassivierungsschicht ein Material umfasst, das ausgewählt ist aus SiO_2 , Si_3N_4 , Metalloxiden, einem Polymer, oder einer Mischung dieser Materialien. Besonders bevorzugte Metalloxide sind Wolframoxid und Aluminiumoxid. Ein besonders bevorzugtes Polymer ist Polyamid. Mit den genannten Materialien lassen sich verhältnismäßig leicht Oberflächenpassivierungsschichten herstellen, die einfach auf unbeschichteten Messelektroden angebracht werden können, eine gute Haltbarkeit und Beständigkeit der Messelektroden bei der Verwendung in erfindungsgemäßen Verfahren bewirken und die Messung der Änderung elektrischer Größen im wesentlichen nicht behindern oder gar verhindern. Vorzugsweise haben Oberflächenpassivierungsschichten eine Dicke von 10 nm bis zu einigen 100 nm.

[0026] Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Schritte a) und b) gleichzeitig durchgeführt werden. Solche Verfahren ermöglichen es, einen hohen Probendurchsatz zu erzielen. Sie gestatten es zudem, das Bindungsverhalten der Substanz an den ersten Rezeptor zu untersuchen.

[0027] Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem in einer Lösung eine oder mehrere Substanzen nachgewiesen werden können, indem die wässrige Lösung in mehreren erfindungsgemäßen Verfahren nacheinander oder gleichzeitig eingesetzt wird, wobei sich die Verfahren in den jeweils verwendeten ersten und/oder zweiten Rezeptoren unterscheiden. Besonders bevorzugt ist es dabei, wenn die Verfahren in mehreren Messzellen parallel durchgeführt werden, wo-

bei die Messzellen zu einem einheitlichen Bauteil vereinigt sind. Auf diese Weise können mit einem einzigen Messzellen-Bauteil mehrere unterschiedliche Substanzen gleichzeitig nachgewiesen und/oder beispielsweise eine Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Somit kann die Analyse komplexer Lösungen vorteilhaft vereinfacht und beschleunigt werden.

[0028] Schließlich ist die Verwendung von Mikropartikeln in einem der zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren sowie die Verwendung einer Messzelle in einem der zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt. Mit der Verwendung von Mikropartikeln und/oder Messzellen können die zuvor beschriebenen Verfahrensvorteile verwirklicht werden.

[0029] Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind durch die Merkmale der Unteransprüche gekennzeichnet.

[0030] Die Erfindung wird nachfolgend anhand bevorzugter Ausführungsbeispiele und Figuren näher erläutert. Es stellen dar:

[0031] Fig. 1 perspektivische Darstellung einer Messzelle mit Mikropartikeln,

[0032] Fig. 2 Querschnitt durch eine Messzelle nach Fig. 1,

[0033] Fig. 3 Prinzipdarstellung eines Rezeptor-Ligand-Systems.

[0034] Fig. 1 zeigt eine perspektivische Darstellung einer Messzelle 1. Diese umfasst einen Träger 2. Auf dem Träger 2 ist eine Oberflächenschicht 5 angeordnet. Die Oberflächenschicht 5 umfasst einen ersten Rezeptor 20 (siehe Fig. 3; hier nicht dargestellt).

[0035] Auf der Oberflächenschicht 5 sind zwei Messelektroden 10, 10' angeordnet. Die Messelektroden besitzen Finger 12, 12', die jeweils in den Raum zwischen den Messelektroden 10, 10' vorspringen. Die Messelektroden 10, 10' bilden somit eine Interdigitalstruktur.

[0036] In Fig. 2 ist ein Querschnitt durch eine Messzelle nach Fig. 1 dargestellt. Elektrische Feldlinien 18 sind schematisch zwischen jeweils zwei im Querschnitt gezeigten Fingern 12, 12' der Messelektroden 10, 10' dargestellt. Oberhalb der Oberflächenschicht 5, also auf ihrer dem Träger 2 abgewandten Seite, befindet sich eine Flüssigkeit (nicht dargestellt). Die Flüssigkeit enthält Mikropartikel 30. Diese sind zu einem Teil an die Oberflächenschicht 5 zwischen den Fingern 12, 12' der Messelektroden 10, 10' gebunden, zum anderen Teil schweben sie ungebunden in der Flüssigkeit.

[0037] Fig. 3 zeigt anhand einer schematischen Querschnittsansicht einer Messzelle nach Fig. 1 das Prinzip eines Rezeptor-Ligand-Systems. Auf der Oberflächenschicht 5 ist ein erster Rezeptor 20 gebunden. Dieser Rezeptor ist eine Einzelstrang-DNA. Links dargestellt schwebt oberhalb des ersten Rezeptors 20, also auf der dem Träger 2 abgewandten Seite der Oberflächenschicht 5, in einer Flüssigkeit (nicht dargestellt) ein Mikropartikel 30 (linke Seite von Fig. 3). Auf der Oberfläche des Mikropartikels 30 ist ein zweiter Rezeptor 29 gebunden. Der zweite Rezeptor 29 ist ebenfalls eine einzelsträngige DNA. An den zweiten Rezeptor 29 ist eine nachzuweisende Substanz 25 als Ligand gebunden. Die Substanz 25 umfasst eine Nucleinsäure, von der ein endständiger Abschnitt an einen Abschnitt des zweiten Rezeptors 29 gekoppelt ist; eine solche Kopplung kann durch Hybridisieren der beteiligten Abschnitte erzielt werden.

[0038] Auf der rechten Seite in Fig. 3 ist die Bindung eines Mikropartikels 30 an die Oberflächenschicht 5 dargestellt. Der erste Rezeptor 20 hat an einen Abschnitt der Substanz 25 gebunden. Ein weiterer Abschnitt, der dem zur Bindung mit dem ersten Rezeptor 20 verwendeten Abschnitt der Substanz 25 gegenüberliegt, ist an einen Abschnitt des

zweiten Rezeptors 29 gebunden. Der zweite Rezeptor 29 wiederum ist an ein Mikropartikel 30 gebunden.

[0039] Zur Durchführung des Nachweis-Verfahrens werden zunächst Mikropartikel 30 mit an ihrer Oberfläche angeordneten zweiten Rezeptoren 29 mit einer die Substanz 25 enthaltenden Flüssigkeit gemischt. Die Substanz 25 bindet dann jeweils mit einem Abschnitt an den zweiten Rezeptor 29. Die Stringenz der Bindungsreaktion kann durch Einstellen von Temperatur und pH-Wert beeinflusst werden. In Abhängigkeit von dem verwendeten zweiten Rezeptor 29 ist es auch möglich, Blockierungssubstanzen vorzusehen, um eine unspezifische Bindung anderer Substanzen als der Substanz 25 an den zweiten Rezeptor 29 zu verhindern.

[0040] Nach dem Binden der Substanz 25 an den zweiten Rezeptor 29 und damit auch an Mikropartikel 30 kann die gebundene Substanz 25 anhand der Mikropartikel 30 aus der Flüssigkeit extrahiert werden. Dazu kann ein äußeres Magnetfeld angelegt werden, so dass die zuvor in der Flüssigkeit frei schwebenden Mikropartikel 30 unter der Wirkung des angelegten Magnetfelds aus der Flüssigkeit herausgezogen werden. In einem Waschschritt können die aus der Flüssigkeit herausgezogenen Mikropartikel 30 von Resten der Flüssigkeit befreit werden. Die Mikropartikel 30 mit der über den zweiten Rezeptor 29 daran gebundenen Substanz 25 können anschließend erneut in eine Flüssigkeit aufgenommen werden. Für die Durchführung des Verfahrens ist ein solcher Extraktionsschritt jedoch nicht notwendig; auch die ursprüngliche Flüssigkeit, die Mikropartikel 30 mit daran gebundener Substanz 25 umfasst, kann gegebenenfalls in den weiteren Verfahrensschritten eingesetzt werden.

[0041] Nach Aufnahme der Mikropartikel 30 in eine Flüssigkeit oder unmittelbar nach Binden der Mikropartikel 30 an die Substanz 25 in einer Flüssigkeit wird die die Mikropartikel 30 umfassende Flüssigkeit in eine Durchflusszelle mit einer Messzelle 1 gespült. Dabei können freie Abschnitte der an den zweiten Rezeptor 29 gebundenen Substanz 25 an Abschnitte des ersten Rezeptors 20 binden (Hybridisieren). Auf diese Weise werden Mikropartikel 30 über die Bindung ihrer ersten Rezeptoren 29 an die Substanz 25 und über deren Bindung an erste Rezeptoren 20 an die Oberflächenschicht 5 gebunden.

[0042] Durch die Bindung der Mikropartikel ändert sich das elektrische Feld der Messzelle 1. Nach Kalibrieren der Messzelle ist es durch Messung der Konduktivität und/oder der Kapazität der Messelektroden 10, 10' möglich, die Menge der an die Oberflächenschicht 5 gebundenen Mikropartikel 30 zu bestimmen. Damit ist es auch möglich, die Konzentration der Substanz 25 zu bestimmen. Werden die elektrischen Größen in Abhängigkeit von der Zeit gemessen, während die Substanz 25 oder die Mikropartikel 30 eingegeben werden, so kann zudem die Bindungskinetik der Substanz an die ersten und/oder zweiten Rezeptoren ermittelt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen einer Substanz in einer Flüssigkeit, umfassend die Schritte:

- a) Eingeben der die Substanz enthaltenden Flüssigkeit in eine Messzelle, die zumindest zwei Messelektroden und eine Oberfläche mit ersten Rezeptoren zum Binden der Substanz umfasst,
- b) Messen von Änderungen elektrischer Größen mittels der Messelektroden, wobei die Änderungen durch das Binden der Substanz an die ersten Rezeptoren hervorgerufen werden,

dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz in Schritt b) mit Mikropartikeln verbunden ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Substanz vor oder während Schritt b) über zweite Rezeptoren mit den Mikropartikeln verbunden wird.
3. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikropartikel magnetisch, vorzugsweise ferromagnetisch sind. 5
4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die an Mikropartikel gebundene Substanz vor Schritt b) im wesentlichen abgetrennt wird von nicht an die Mikropartikel gebundener Substanz. 10
5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz eine Nucleinsäure umfasst und die ersten und/oder zweiten Rezeptoren jeweils eine erste bzw. zweite Nachweis-Nucleinsäure umfassen, die jeweils mit einem Abschnitt der Nucleinsäure der Substanz hybridisieren kann. 15
6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand zwischen jeweils zwei benachbarten Messelektroden der Messzelle weniger als 1 µm, vorzugsweise weniger als 500 nm beträgt. 20
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messelektroden mit einer Oberflächenpassivierungsschicht versehen sind. 25
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberflächenpassivierungsschicht eine Schicht aufweist, die aus SiO₂, Si₃N₄, einem Metalloxid, Aluminiumoxid, Wolframoxid, Polyamid oder einem anderen Polymer oder einer Mischung zweier oder mehrerer der genannten Substanzen besteht. 30
9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) und b) gleichzeitig durchgeführt werden.
10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die mit den Messelektroden in Schritt b) gemessenen Änderungen Kapazitäts- und/oder Leitfähigkeitsänderungen sind. 35
11. Verwendung von Mikropartikeln in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10. 40
12. Verwendung einer Messzelle in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

- Leerseite -

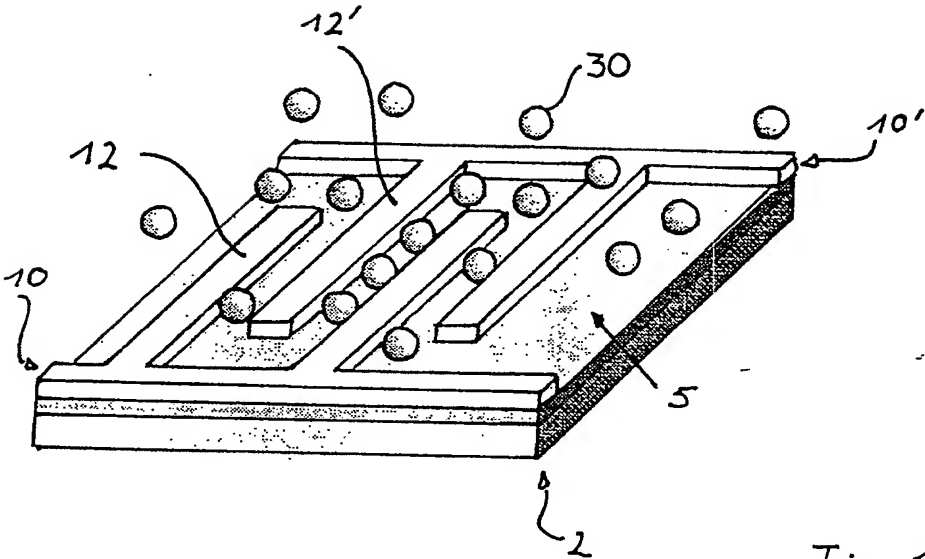


Fig. 1

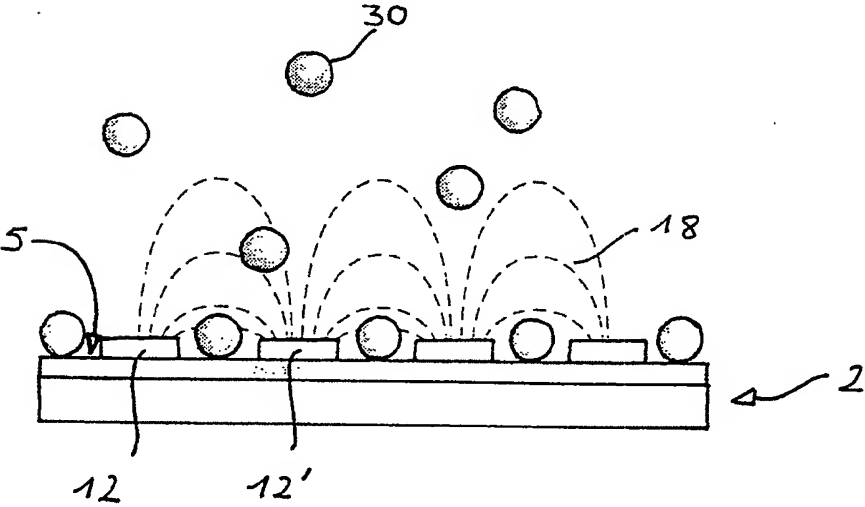


Fig. 2

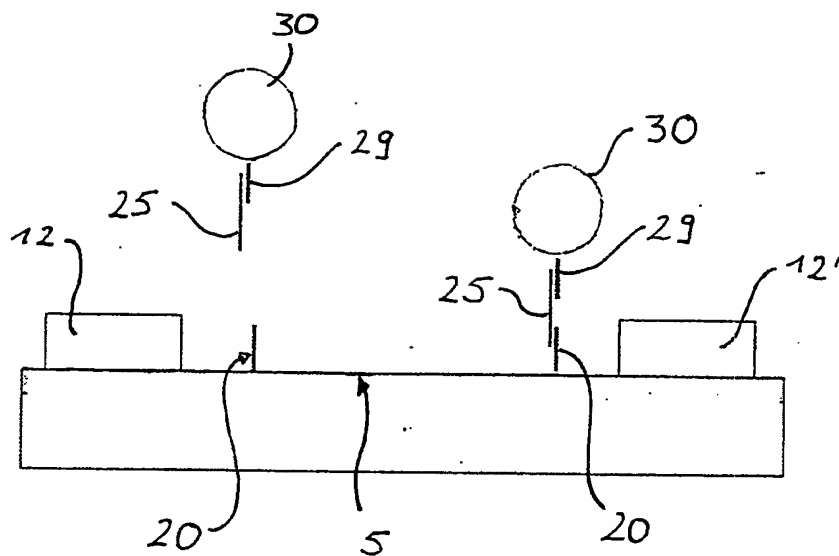


Fig. 3